

Variabilidad de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en suelo y hojarasca de cacao en El Oro, Ecuador

Variability of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in cocoa cultivars, in the province of El Oro, Ecuador

Salomón Barrezueta Unda^{1,2,†}, Antonio Paz González²,
Ángel Eduardo Luna Romero³ y Edwin Jaramillo Aguilar¹

¹ Universidad Técnica de Machala, Unidad Académica de Ciencias Agropecuarias. Av. Panamericana km 5½. Machala, Ecuador.

[†]Autor para correspondencia (sabarrezueta@utmachala.edu.ec)

² Universidad de A Coruña (UDC), Facultad de Ciencias. 15008 A Coruña, España.

³ Universidad Nacional Agraria "La Molina", Escuela de Pos-grado, Av. La Molina s/n. Lima-Perú.

RESUMEN

El cacao aporta niveles significativos de carbono (C) y nitrógeno(N) por las hojarascas; el cambio de manejo agronómico ocasiona variación en los contenidos de estos elementos en el suelo. El objetivo fue evaluar las variaciones de los isotopos de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, entre dos tipos de cacao (CCN51 y Nacional), localizados en tres órdenes de suelo en la provincia de El Oro, Ecuador. Se tomaron 30 muestras de suelo a 0.30 m de profundidad y 25 muestras de hojarasca y se analizó la abundancia de los isótopos de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$. Los datos se analizaron considerando dos factores, tipos de cacao (CCN51 y Nacional) y orden de suelos (Alfisol, Entisol e Inceptisol). Los resultados muestran que los rangos del isótopo de $\delta^{13}\text{C}$ en suelo fueron de -23.81% (CCN51, Entisol) a -26.46% (Nacional, Entisol) y en hojarasca de -27.21% (CCN51, Alfisol) a -29.86% (Nacional, Inceptisol). Los rangos del isótopo de $\delta^{15}\text{N}$ en suelo fueron de 7.96% (Nacional, Entisol) y 10.48% (Nacional, Alfisol) y en hojarasca de 4.85% (Nacional, Entisol) a 8.38% (CCN51, Alfisol). Los promedios del $\delta^{13}\text{C}$ en el suelo correspondieron a plantas tipo C3. Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en suelo y hojarasca fue un indicador de baja incidencia de fertilizantes nitrogenados de origen inorgánico en Nacional y de alta mineralización alta del N en CCN51.

Palabras clave: carbono, materia orgánica, nitrógeno.

SUMMARY

The cocoa provides significant levels of carbon (C) and nitrogen (N) by the leaf litter; the change of agronomic management causes variation in the contents of these elements in the soil. The objective was to evaluate the variations of the isotopes of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ between two types of cocoa (CCN51 and Nacional), located in three soil orders in the province of El Oro, Ecuador. Thirty soil samples of 0.30 m deep and 25 samples of leaf litter were taken and the abundance of the isotopes of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ were analyzed. The data were analyzed including two factors, cocoa types (CCN51 and Nacional) and order of soils (Alfisol, Entisol and Inceptisol). The results showed that the ranges of the isotope of $\delta^{13}\text{C}$ in soil were -23.81% (CCN51, Entisol) to -26.46% (Nacional, Entisol) and in leaf litter -27.21% (CCN51, Alfisol) to -29.86% (Nacional, Inceptisol). The ranges of the isotope of $\delta^{15}\text{N}$ in soil were of 7.96% (Nacional, Entisol) and 10.48% (Nacional, Alfisol) and in leaf litter of 4.85% (Nacional, Entisol) to 8.38% (CCN51, Alfisol). The averages of the $\delta^{13}\text{C}$ in the soil were plants type C3. The values of $\delta^{15}\text{N}$ in litter and soil was an indicator of low incidence of fertilizers nitrogenous origin inorganic in Nacional and high mineralization of N in CCN51.

Index words: carbon, organic matter, nitrogen.

Cita recomendada:

Barrezueta Unda, S., A. Paz González, Á. E. Luna Romero y E. Jaramillo Aguilar. 2019. Variabilidad de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en suelo y hojarasca de cacao en El Oro, Ecuador. Terra Latinoamericana 37: 131-140.
DOI: <https://doi.org/10.28940/terra.v37i2.202>

Recibido: 17 de enero de 2017.

Aceptado: 26 de febrero de 2019.

Publicado en Terra Latinoamericana 37: 131-140.

INTRODUCCIÓN

Los ciclos del carbono (C) y nitrógeno (N) terrestre están estrechamente ligados a las necesidades metabólicas de las plantas y a la materia orgánica del suelo (MOS), la cual se deriva principalmente, desde la vegetación como residuos de la biomasa (de Rouw *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018). Las proporciones de C y N en el suelo influyen en la liberación de los nutrientes esenciales para la sostenibilidad de los ecosistemas (Gautam *et al.*, 2016). Por consiguiente, los cambios en el uso y transición del suelo, podrían alterar el ciclo del C y N; así como, el nivel de la MOS, lo cual merece una atención especial. (Loss *et al.*, 2014).

Para analizar ésta dinámica, se utilizan los isótopos estables de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ (de Rouw *et al.*, 2015). En el caso del isótopo de $\delta^{13}\text{C}$, es una herramienta para describir sucesiones de cultivos o cambios en los usos de suelo, cuando se sustituyen plantas C3 ($\delta^{13}\text{C}$, -32 a -22‰) por C4 ($\delta^{13}\text{C}$, -17 a -9‰) y viceversa (O'Leary, 1988; Bai *et al.*, 2012; de Rouw *et al.*, 2015). En el caso de la abundancia del isótopo de $\delta^{15}\text{N}$ en el suelo, es utilizado para cuantificar el grado de intervención antropogénica, en relación a la fertilización (Park *et al.*, 2011), o a problemas fisiológicos de la planta como el estrés hídrico. (Nakano y Uehara, 2007).

Los niveles de los $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ que se determinan de la hojarasca, ramas viejas o en residuos de la cosecha, son utilizados como trazadores del origen geográfico de las plantas (Craine *et al.*, 2015; Tezara *et al.*, 2016). En ramas, frutos, raíces o hojas vivas o muertas, las señales isotópicas de $\delta^{15}\text{N} > 6\%$ indican una gran posibilidad que el material vegetal provenga de una finca cultivada de forma orgánica (Rogers, 2008).

La discriminación que realizan los isótopos de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, ha demostrado ser útil para comprender y caracterizar el mayor o menor aporte de C y N en la hojarasca (Gautam *et al.*, 2016). En este contexto, se debe prestar atención a cultivos como el cacao (*Theobroma cacao* L.), que aportan un significativo nivel de C y N a través de la biomasa que genera junto con los árboles asociados (Fontes *et al.*, 2014; Monroe *et al.*, 2016). Pero los cambios en el manejo agronómico (de agroforestal a monocultivo, por ejemplo) puede incidir en la reserva del C y N, y por consiguiente, en los niveles de MOS y disponibilidad de los nutrientes del suelo (Dawo *et al.*, 2014).

Ecuador, es reconocido como el primer productor mundial de cacao (*Theobroma cacao* L.) fino de

aroma, conocido también como Nacional (Pérez-Neira, 2016). Se cultiva generalmente en asociación con árboles frutales o forestales, factor que incrementa la capacidad de generar biomasa, y almacenar una significativa cantidad de carbono orgánico del suelo (COS) (Hernandez-Jimenez *et al.*, 2017). Además, en el país se cultiva también el clon Colección Castro Naranjal 51 (CCN51), cacao que se caracteriza por su alto rendimiento, pero con un mayor requerimiento nutricional, en comparación con el cacao Nacional (Sánchez-Mora *et al.*, 2013; Herrmann *et al.*, 2015). A pesar de las diferencias señaladas, la capacidad de almacenamiento de COS, principalmente de los órdenes Alfisol, Entisol e Inceptisol es muy similar: para Nacional (cultivado con sombra), varía entre 33.3 Mg ha⁻¹ y 70.6 Mg ha⁻¹, y el cacao CCN51 (cultivado sin sombra), el cual se encuentra en el rango entre 43.80 Mg ha⁻¹ y 65.20 Mg ha⁻¹ (Jadán *et al.*, 2012; Reyna-Bowen *et al.*, 2019).

En Ecuador, son pocos los trabajos publicados sobre las relaciones isotópicas de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ como los realizados por Paul *et al.* (2008) y Rhoades *et al.* (2000) en suelos de la cordillera de los Andes. En el caso del cacao, las investigaciones realizadas por Perini *et al.* (2016) y Tezara *et al.* (2016) en hojas y semillas respetivamente, permitieron conformar un perfil isotópico del origen geográfico del cacao ecuatoriano. Por lo anterior, este trabajo propuso evaluar las variaciones de los $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, determinadas en el suelo y la hojarasca, entre CCN5 y Nacional, localizados en tres órdenes de suelo en la provincia de El Oro.

MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del Área en Estudio

Las fincas cacaoteras donde se realizó el estudio se localizan al noreste de la provincia El Oro (Ecuador), principalmente en los municipios de: El Guabo, Machala, Pasaje y Santa Rosa; ubicadas entre las coordenadas 3° 5'-3° 30' S y 79° 0'-79° 39' O (Figura 1). La precipitación promedio anual entre los años 1975 al 2010 fue de 912 mm y la temperatura media de 26 °C (Luna-Romero *et al.*, 2018). El suelo es de origen aluvial, formado de material fluvial y marino, encontrándose los órdenes: Inceptisol, Alfisol y Entisol, con predominio de las fracciones mineralógicas, limo y arena sobre la arcilla (Moreno *et al.*, 2016).

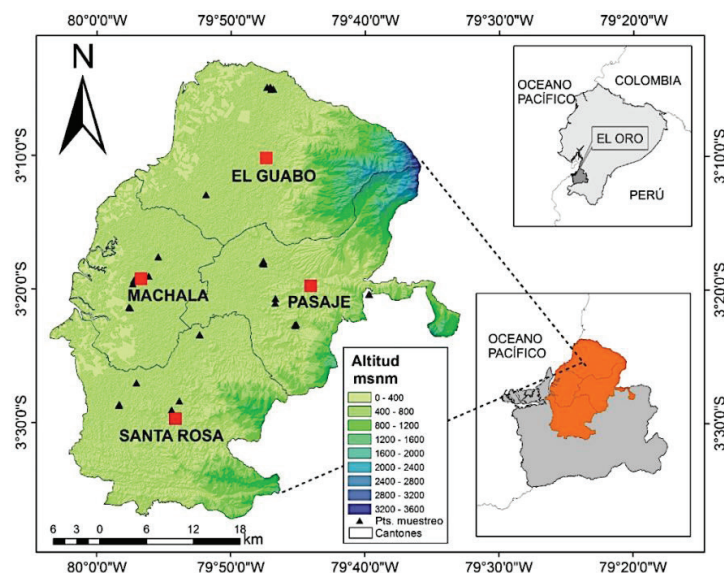


Figura 1. Localización geográfica del área muestreada.

Figure 1. Geographical location of the sampled area.

Descripción del Muestro

Para el presente estudio, se tomaron 25 fincas cacaoteras de forma aleatoria con una superficie promedio de 2 ha, que se separaron en: fincas con cacao Nacional, de baja incidencia de fertilización inorgánica, riego irregular y escaso control fitosanitario; y fincas con cacao CCN51, con fertilización inorgánica, riego y control fitosanitario regular. Se consideró la homogeneidad del terreno (observación en campo) y su relieve; en los casos de cambios bruscos del suelo, se tomaron muestras adicionales quedando estructura el muestreo en 30 parcelas (12 del cacao Nacional y 18 del cacao CCN51). El trabajo de campo se realizó entre julio y octubre del 2015.

Muestras de suelo. El patrón de muestreo utilizado para el suelo fue en zig-zag, extrayendo submuestras de los primeros 0.30 m de profundidad por cada parcela; se depositaron en un recipiente limpio y se extrajo 1000 g de suelo. Las muestras fueron secadas al aire, bajo sol, por 72 h, homogenizadas y tamizadas con malla de 2 mm, para su posterior envío al laboratorio (500 g para los análisis de las propiedades físicas y químicas y 5 g para los análisis elemental e isotópico).

Muestras de hojarasca. Las muestras de hojarasca fueron tomadas con un marco de madera de 0.25 m² que se ubicó debajo de los árboles, siguiendo el recorrido de las submuestras de suelo hasta coleccionar

1000 g. Las muestras fueron secadas en horno a 60 °C por 48 h; posteriormente, se trituraron con la mano y se tamizaron con malla de 0.5 mm. De hojarasca se extrajo 5 g por muestra, para su posterior análisis elemental e isotópico.

Conformación de grupos. Las muestras (30 de suelo y 25 de hojarasca), se enlistan en el Cuadro 1, por tipo de cacao y por orden de suelo (Alfisol, Entisol, Inceptisol), las plantas de mayor edad pertenecen al cacao Nacional. La diferencia de altitud entre las fincas, por orden de suelo y tipo de cacao, muestra una diferencia de 5 a 703 m (Figura 2).

Análisis de Laboratorio

Con las muestras de suelo se determinó: el porcentaje de las partículas del suelo (arena, limo y arcilla) por el método del hidrómetro (Beverwijk, 1967), el pH en agua con relación 1:2.5, y la capacidad de intercambio catiónico (CIC) en acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 1N en pH 7 (USDA-NRCS, 2014). También se determinó la densidad aparente (D_a) por medio de la Ecuación (1) de Bernoux *et al.* (1998). Los análisis fueron realizados en el laboratorio de suelos de la Universidad Técnica de Machala (Ecuador).

$$D_a = 1.398 - 0.0047 * \text{clay} - 0.042 * CO \quad (1)$$

Cuadro 1. Numero de muestras por orden de suelo y hojarasca por tipos de cacao.
Table 1. Number of samples by soil orders and leaf litter of cocoa types.

Tipo de cacao	Alfisol			Entisol			Inceptisol		
	Edad	Suelo	hojarasca	Edad	Suelo	hojarasca	Edad	Suelo	hojarasca
CCN51	8	7	6	6	5	3	9	6	6
NACIONAL	12	2	2	26	4	3	44	6	5
Total		9	8		9	6		12	11

La edad de las plantas está representada en años.

The age of the plants is represented in years.

El C (%) y el N (%) elemental, fueron realizados, junto con la determinación de los isótopos de $\delta^{13}\text{C}$ y de $\delta^{15}\text{N}$ del suelo y la hojarasca, en el laboratorio de análisis elemental de la Universidad de La Coruña (España). Se tomó una porción de 5 mg de suelo y hojarasca de las muestras, se encapsularon en estaño y se colocaron en un analizador modelo FlashEA1112 (Thermo Finnigan, Oregón, USA); manteniendo las siguientes condiciones analíticas: temperatura de oxidación 1020 °C, temperatura de reducción 650 °C, flujo gas portador helio 100 mL por minuto y una de presión de oxígeno de 100 Kpa.

Los resultados isotópicos se expresan en delta (por mil (%)) a partir de la proporción relativa del isótopo pesado $\delta^{13}\text{C}$ al isótopo ligero $\delta^{12}\text{C}$ en una muestra

(R_{sample}), con relación al Vienna–Pee Dee Belemnite ($R_{\text{V-PDB}}$) (Korenaga *et al.*, 2019). El $\delta^{15}\text{N}$ fue expresado con relación $\delta^{15}\text{N}/\delta^{14}\text{N}$ (R_{sample}) con el estándar de Nitrógeno Atmosférico (R_{AIR}) (Korenaga *et al.*, 2019). El error de réplica fue de 0.3% para $\delta^{13}\text{C}$ y el 0.5% para $\delta^{15}\text{N}$. La abundancia isotópica de las muestras se estructuró en las Ecuaciones $\delta^{13}\text{C}$ (2) y $\delta^{15}\text{N}$ (3) empleadas por Squeo y Ehleringer (2004):

$$\delta^{13}\text{C} = \left[\frac{R_{\text{sample}} - R_{\text{VPDB}}}{R_{\text{VPDB}}} \right] * 1000 \quad (2)$$

$$\delta^{15}\text{N} = \left[\frac{R_{\text{sample}} - R_{\text{AIR}}}{R_{\text{AIR}}} \right] * 1000 \quad (3)$$

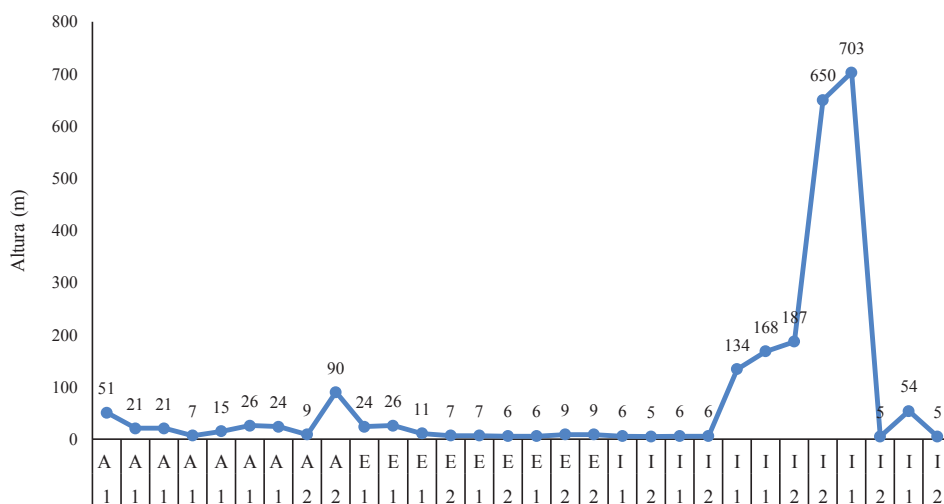


Figura 2. Ubicación de las fincas por altura, enlistado en orden de suelo y tipos de cacao.
A = Alfisol; E = Entisol; I = Inceptisol. 1 = CCN51; 2 = Nacional.

Figure 2. Location of the farms by height, listed in soil orders and cocoa types.
A = Alfisol; E = Entisol; I = Inceptisol. 1 = CCN51; 2 = Nacional).

Análisis Estadístico

Todos los datos fueron analizados con el programa SPSS versión 23 (SPSS, 2013). Las propiedades físicas y químicas de los suelos fueron tratadas con la media. Para establecer diferencia entre los isotopos de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (orden de suelo y tipo de cacao) con nivel de significancia de 5%. Las medias del C y N elemental, y de los isotopos $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ del suelo y la hojarasca por orden de suelo, fueron analizadas con la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis Descriptivos de las Muestras

Los promedios de las variables físicas y químicas de los suelos, mostraron una condición adecuada para el cultivo del cacao (Cuadro 2). Los valores de arena (Alfisol = 354 g kg⁻¹; Entisol = 425 g kg⁻¹; Inceptisol = 374 g kg⁻¹), limo (Alfisol = 406 g kg⁻¹; Entisol = 325 g kg⁻¹; Inceptisol = 303 g kg⁻¹) y arcilla (Alfisol = 240 g kg⁻¹; Entisol = 250 g kg⁻¹; Inceptisol = 324 g kg⁻¹); permitieron clasificar los suelos con el triángulo de textura en: franco (Alfisol), franco arcilloso (Entisol) y franco arcilloso (Inceptisol). La Da registró valores altos que crecieron a medida que las muestras de suelo fueron tomadas a mas altura y la cantidad de arcilla aumentaba (Alfisol 1.21 g cm⁻³; Entisol 1.19 g cm⁻³; Inceptisol 1.70 g cm⁻³). Los promedios de pH indicaron una reacción química con tendencia hacia la neutralidad (Alfisol pH = 7.22; Entisol pH = 7.37; Inceptisol pH = 6.31). Los valores de CIC fueron: 27.33 cmol (+) g⁻¹ (Alfisol), 37.78 cmol (+) g⁻¹ (Entisol) y 27.43 cmol (+) g⁻¹ (Inceptisol); resultados superiores al nivel óptimo para cacao de 19.36 cmol(+) g⁻¹ (Amores *et al.*, 2010;

Snoeck *et al.*, 2016). Valores similares a los mostrados, fueron reportados por Fontes *et al.* (2014); Arévalo-Gardini *et al.* (2015); Rosas-Patiño *et al.* (2017) en Perú, Brasil y Colombia respectivamente, en suelos cacaoteros con manejo agroforestal y en monocultivo.

Análisis de Varianza (ANOVA) de Isotopos $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de Suelos Cultivados con Cacao

El ANOVA de dos vías, permitió establecer diferencias significativas ($P < 0.05$) por tipo de cacao del isotopo de $\delta^{13}\text{C}$ y por orden de suelo del isotopo de $\delta^{15}\text{N}$ (Cuadro 3). Los promedios de $\delta^{13}\text{C}$ por orden de suelo, fueron menores en Nacional (Alfisol, -25.44% ± 0.87 ; Entisol, -26.46% ± 1.72) con respecto a CCN51 (Alfisol, -24.55% ± 2.12 ; Entisol, -23.81% ± 1.46). En el orden Inceptisol, donde se registró la mayor diferencia de edad entre las parcelas de Nacional (44 años) y CCN51 (9 años), la diferencia de $\delta^{13}\text{C}$ fue muy reducida (Nacional, -25.70% ± 1.13 ; CCN51, -25.22% ± 1.49). Rhoades *et al.* (2000), en suelos del orden Andisol en Ecuador con rango de arcilla de 287-639 g kg⁻¹, encontró poca diferencia entre los suelos de bosque primario (-29.4% ± 0.8 a -29.9% ± 0.3) y bosque secundario (-29.30% ± 0.8 a -30.10% ± 0.0). En el presente estudio, la poca diferencia en las cantidades de arcilla, pudo ser un factor para no encontrar diferencias significativas del $\delta^{13}\text{C}$ por orden de suelo. Por otra parte, varios investigadores coinciden que la acumulación de biomasa microbiana en los primeros 30 cm, influye en el incremento del isotopo de $\delta^{13}\text{C}$, y que se ubiquen entre -23.00 y -26.00%, en suelos con uso agronómico (Carvajal *et al.*, 2009; Gautam *et al.*, 2016).

En el caso del isotopo de $\delta^{15}\text{N}$, los valores más altos, por tipo de cacao, se presentaron en Alfisol (CCN51, 9.69%; Nacional, 10.48%), de textura franco; y los de menor valor en Entisol (CCN51,

Cuadro 2. Promedios de propiedades físicas y químicas por orden de suelo.
Table 2. Averages of physical and chemical properties by soil orders.

Ordenes de suelo	Arena	Limo	Arcilla	Textura	Da	pH	CIC
	- - - - - g kg ⁻¹ - - - - -				g cm ⁻³		
Alfisol	354	406	240	Franco	1.21	7.22	27.33
Entisol	425	325	250	Franco-arcilloso-arenoso	1.19	7.37	37.78
Inceptisol	374	303	324	Franco-arcilloso	1.7	6.31	27.43

Cuadro 3. Media de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de suelos cultivados con cacao. Desviación estándar entre paréntesis.
Table 3. Average of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ of soils cultivated with cocoa. Standard deviation in parentheses.

Orden	Alfisol	Entisol	Inceptisol	ANOVA ($P < 0.05$)	
Tipo		$\delta^{13}\text{C}$		Orden	Tipo
CCN51	-24.55 (2.12)	-23.81 (1.46)	-25.22 (1.49)	0.82	0.04
NACIONAL	-25.44 (0.87)	-26.46 (1.72)	-25.70 (1.13)	Interacción	0.32
		$\delta^{15}\text{N}$			
CCN51	9.69 (0.90)	8.24 (1.76)	8.95 (0.80)	0.04	0.85
NACIONAL	10.48 (3.74)	7.96 (1.02)	8.09 (1.67)	Interacción	0.53

El análisis de varianza (ANOVA) de dos vías consideró dos fuentes de variación, órdenes de suelo y tipos de cacao.
 The two-way analysis of variance (ANOVA) considered two sources of variation, soil orders and cocoa types.

8.24%; Nacional, 7.96%), de textura franco arenoso. Factor importante es la clase de textura, debido que en suelos franco arenosos el N se lixivia a capa inferiores del suelo, siendo una posible causa de la menor proporción del $\delta^{15}\text{N}$ en Entisol. Por otro lado, estos resultados, se interpretan como indicadores de bajo nivel de fertilización inorgánica por esta sobre el 6.60% de $\delta^{15}\text{N}$ para plantas tipo C3 (Amundson *et al.*, 2003). En el caso del cacao CCN51, con fertilización inorgánica regular, el procesos de reciclaje de N entre el suelo y la atmosfera conducen a pérdidas en forma NH_3 , a través de la volatilización y desnitrificación, resultando en el enriquecimiento de $\delta^{15}\text{N}$ en el suelo (Bateman *et al.*, 2007; Dixon *et al.*, 2010; Koba *et al.*, 2012). Esto indica que la fertilización inorgánica de las granjas con cacao CCN51 fue realizada con fertilizantes amoniacales.

Análisis de Varianza (ANOVA) de Isotopos $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ de Hojarasca de Cacao

El ANOVA para los isotopos de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en hojarasca de cacao, presentó diferencias significativas ($P < 0.05$) para $\delta^{13}\text{C}$ por orden de suelo (Cuadro 4). Los promedios mínimos del isotopo de $\delta^{13}\text{C}$ en la hojarasca por tipo de cacao se obtuvieron en Inceptisol (CCN51, $-29.86\% \pm 1.57$; Nacional, $-29.36\% \pm 0.77$), valores muy similares a los obtenidos por Tezara *et al.* (2016) en hojas vivas de cacao ($-29.21\% \pm 0.2$). El mayor promedio del isotopo de $\delta^{13}\text{C}$, fueron muy similares en Alfisol (CCN51, $-27.21\% \pm 0.74$) y Entisol (Nacional, $-27.80\% \pm 1.30$), ubicadas en áreas de mayor radiación solar, con respecto a las fincas localizadas en Inceptisol y cuyos valores están dentro de los niveles isotópico obtenidos por Perini *et al.* (2016) y Diomande *et al.* (2015) en semillas de cacao (-26.00 a -29.00%).

Cuadro 4. Media de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ en hojarasca de cacao.
Table 4. Average of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ in cocoa litter.

Orden	Alfisol	Entisol	Inceptisol	ANOVA ($P < 0.05$)	
Tipo		$\delta^{13}\text{C}$		Orden	Tipo
CCN51	-27.21 (0.74)	-28.93 (0.16)	-29.86 (1.57)	0.01	0.58
NACIONAL	-28.03 (1.30)	-27.80 (1.3)	-29.36 (0.77)	Interacción	0.31
		$\delta^{15}\text{N}$			
CCN51	8.38 (1.86)	5.64 (1.99)	5.71 (3.69)	0.43	0.38
NACIONAL	6.25 (7.83)	4.85 (1.98)	4.77 (3.34)	Interacción	0.92

Desviación estándar entre paréntesis. El análisis de varianza (ANOVA) de dos vías fue calculado para tipo de cacao y orden de suelo.
 Standard deviation in parentheses. The two-way analysis of variance (ANOVA) considered two sources of variation, soil order and cocoa types.

La diferencia isotópica del $\delta^{13}\text{C}$ en las plantas, está asociada a la baja capacidad de retención hídrica del suelo (Araque *et al.*, 2012), en los suelos Alfisol y Entisol, donde el predominio de las fracciones arena y limo, así como, los valores altos de Da (Cuadro 2); son factores que afecta la fotosíntesis, y por tanto, provoca disminución del isótopo de $\delta^{13}\text{C}$ (Farquhar *et al.*, 1989; Squeo y Ehleringer, 2004).

Los promedios por orden de suelo del isótopo de $\delta^{15}\text{N}$, también fueron muy similares entre CCN51, (Alfisol= $8.38\% \pm 1.86$, Entisol= $5.64\% \pm 1.99$, Inceptisol= $5.71\% \pm 3.69$) y Nacional (Alfisol= $6.25\% \pm 7.83$, Entisol= $4.85\% \pm 1.98$, Inceptisol= $4.77\% \pm 3.34$). Farquhar *et al.* (1989) y Araus *et al.* (2003) expresan que los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en hojarasca se ubican entre 0 y 5%, y Craine *et al.* (2015) indican que el rango es entre -7.8 y 8.7%. Pero el trabajo de Tezara *et al.* (2016), en hojas vivas, muestra una variación de $3.84\% \pm 0.48$ (cacaos Forastero) y $5.51\% \pm 0.19$ (cacaos Criollos), similar a las encontrada en la presente investigación en Entisol e Inceptisol.

Comparación de Abundancia de C, N y los Isótopos de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$

Se determinaron, con la prueba de Tukey ($P < 0.05$), en el isótopo de $\delta^{15}\text{N}$ en suelo, el C elemental y el isótopo de $\delta^{13}\text{C}$ en hojarasca de cacao, diferencias significativas entre Alfisol, Entisol e Inceptisol (Cuadro 5). Los valores obtenidos de C (Alfisol= $1.74\% \pm 0.92$; Entisol= $2.12\% \pm 1.39$; Inceptisol= $1.74\% \pm 0.78$) y N (Alfisol= $0.16\% \pm 0.07$; Entisol= $0.19\% \pm 0.11$; Inceptisol= $0.17\% \pm 0.07$) se clasificaron como alto y medio respectivamente; al compararse con los valores de 0.78-1.11% de C y 0.07-0.27% de N obtenidos por Dawoe *et al.* (2014) y de 0.80-2.39% de C y 0.06-0.23% de N por Zaia *et al.* (2012), en suelos cacaoteros del orden Inceptisol en Ghana y Brasil respectivamente. Los valores de N, también fueron similares a los obtenidos por Niether *et al.* (2019), de 0.16 a 0.18%, en plantación de cacao con manejo orgánico en Bolivia.

Los promedios del isótopo de $\delta^{13}\text{C}$ en suelo fueron: $-24.75\% \pm 1.90$ (Alfisol), $-24.99\% \pm 2.03$ (Entisol), $-25.46\% \pm 1.28$ (Inceptisol). Los valores sugieren que la vegetación asociada al cultivo de cacao, como las malezas (Tipo C4) en CCN51 y los árboles frutales asociados a Nacional, no afectaron los niveles de $\delta^{13}\text{C}$, y que no existieron sucesiones recientes a plantas tipo

C4 ($< -20.00 \delta^{13}\text{C}$), un caso similar detalla Dortzbach *et al.* (2015) en sucesiones de bosques primarios conformados por plantas tipo C3 (-28.35%) hacia plantas tipo C3 con manejo agronómico (-26.20%). En el caso de los suelos en estudio si hubiere cambios de Nacional a CCN51 la discriminación isotópica del $\delta^{13}\text{C}$, sería mínima.

Los valores del isótopo de $\delta^{15}\text{N}$ en el suelo fueron: $9.87\% \pm 1.58$ (Alfisol); $8.11\% \pm 1.40$ (Entisol); $8.52\% \pm 1.32$ (Inceptisol). Estas diferencias pueden estar asociada a la correlación positiva entre el N que aporta la hojarasca y el N mineralizado en el suelo (Paolini *et al.*, 2016). Aunque las condiciones de manejo son diferentes en cuanto a la aplicación de fertilizantes inorgánicos y riego, labores como la poda son comunes en todas las fincas, generando nuevos brotes, y por tanto, una entrada constante de biomasa al suelo (Salgado-Mora *et al.*, 2009; Fontes *et al.*, 2014).

En el análisis del C y N elemental en suelo (Cuadro 5), los promedios más altos fueron en Inceptisol (C, $40.30\% \pm 3.19$; N, $1.53\% \pm 0.31$) y los valores mínimos en Alfisol (C, $33.89\% \pm 5.52$; N, $1.38\% \pm 0.29$). Puentes-Páramo *et al.* (2014) y Salgado-Mora *et al.* (2009) explican que los niveles de C y N en hojarasca, son superiores en plantaciones de cacao con edad entre 4 y 16 años de cultivadas, sin sombra; producto de una mayor emisión foliares en comparación con los árboles mayores de 30 años, lo que ocasiona mayor acumulación de biomasa. Este aspecto no guarda relación con el presente estudio, debido que las plantas de cacao de mayor edad que se ubican en el orden de suelo Inceptisol, fueron las que mayor nivel de C.

El isótopo de $\delta^{13}\text{C}$ en hojarasca, mostró valores inferiores a los determinados en el suelo (Alfisol= $-27.42\% \pm 0.88$; Entisol= $-28.37\% \pm 29.63$; Inceptisol= $-29.63\% \pm 1.24$), mientras que los promedios del isótopo de $\delta^{15}\text{N}$ en hojarasca fueron: $7.84\% \pm 3.49$ (Alfisol), $5.25\% \pm 1.82$ (Entisol) y $5.28\% \pm 3.39$ (Inceptisol), inferior a los encontrado en el suelo (Cuadro 5). Squeo y Ehleringer (2004) expresan que la variación isotópica del $\delta^{15}\text{N}$ entre el material vegetal y el suelo, presenta un fraccionamiento menor que el isótopo de C, por lo que su proporción no tiene una marcada diferencia. La acumulación, por largos periodos de tiempo, de la MOS sin cambio en el uso del suelo en plantas C3 incide un menor nivel del isótopo de $\delta^{13}\text{C}$ y aumento en los niveles del isótopo de $\delta^{15}\text{N}$.

Cuadro 5. Prueba de Tukey ($P < 0.05$).
Table 5. Tukey test ($P < 0.05$).

	Alfisol	Entisol	Inceptisol
Suelo			
C	1.74 (0.92) a	2.12 (1.39) a	1.74 (0.78) a
N	0.16 (0.07) a	0.19 (0.11) a	0.17 (0.07) a
$\delta^{13}\text{C}$	-24.75 (1.90) a	-24.99 (2.03) a	-25.46 (1.28) a
$\delta^{15}\text{N}$	9.87 (1.58) a	8.11 (1.40) b	8.52 (1.32) ab
Hojarasca			
C	33.89 (5.52) b	36.26 (6.21) ab	40.30 (3.19) a
N	1.39 (0.24) a	1.4 (0.26) a	1.53 (0.31) a
$\delta^{13}\text{C}$	-27.42 (0.88) a	-28.37 (1.04) b	-29.63 (1.24) b
$\delta^{15}\text{N}$	7.84 (3.49) a	5.25 (1.82) a	5.28 (3.39) a

CONCLUSIONES

Los niveles de los isótopos de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$, por tipo de cacao (factor asociado al manejo del cultivo) y orden de suelo fue muy reducida, tal vez por lo pequeño de la muestra y la homogeneidad en las propiedades del suelo, principalmente entre las partículas de arena, limo y arcilla. Los valores del $\delta^{13}\text{C}$ en el suelo, fueron de plantas tipo C3, con promedios entre -24.55 y -25.77%. Los valores de $\delta^{15}\text{N}$ en suelo y hojarasca (>6.6%), fue un indicador de la baja incidencia de fertilizantes inorgánicos en el cacao Nacional y de alta mineralización del N en el cacao CCN51. Los rangos de $\delta^{13}\text{C}$ en hojarasca, se ajustan a los determinados por otros autores como trazadores de origen del cacao ecuatoriano.

AGRADECIMIENTOS

La investigación es parte del proyecto “Estimación del secuestro de carbono en suelos cultivados de la Parroquia El Progreso, Pasaje-Ecuador”; N° 294/2017, auspiciado por la Universidad Técnica de Machala (UTMach). Los autores agradecen el apoyo de los técnicos del SAI-Universidad de La Coruña (UDC), y a los grupos de investigación de AGUASOL-UDC y DINTA-UTMach.

LITERATURA CITADA

- Amores P., F. M., C. Suárez C. e I. A. Garzón C. 2010. Producción intensiva de cacao nacional con sabor “arriba” tecnología, presupuesto y rentabilidad. Quevedo, Ecuador: INIAP, Estación Experimental Tropical Pichilingue, Programa Nacional de Cacao y Café. (Manual Técnico no. 82). <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/1630>. Ecuador.
- Amundson, R., A. T. Austin, E. A. G. Schuur, K. Yoo, V. Matzek, C. Kendall, A. Uebersax, D. Brenner, and W. T. Baisden. 2003. Global patterns of the isotopic composition of soil and plant nitrogen. *Global Biogeochem. Cycles* 17: 1031. doi: 10.1029/2002GB001903.
- Araus Ortega, J. L., M. A. Mateo, and P. Ferrio. 2003. Isótopos estables en ecología vegetal. pp. 113-160. Reigosa Roger, M., N. Pedrol and A. M. Sánchez-Moreiras (eds.). La ecofisiología vegetal: Una ciencia de síntesis. Paraninfo. Barcelona, España.
- Araque, O., R. Jaimez, W. Tezars, I. Coronel, R. Urich, and W. Espinoza. 2012. Comparative photosynthesis, water relations, growth and survival rates in juvenile Criollo cacao cultivars (*Theobroma cacao*) during dry and wet seasons. *Exp. Agric.* 48: 513-522. doi: 10.1017/S0014479712000427.
- Arévalo-Gardini, E., M. Canto, J. Alegre, O. Loli, A. Julca, and V. Baligar. 2015. Changes in soil physical and chemical properties in long term improved natural and traditional agroforestry management systems of cacao genotypes in peruvian amazon. *PloS One* 10: e0132147. doi: 10.1371/journal.pone.0132147.
- Bai, E., T. W. Boutton, F. Liu, X. B. Wu, C. T. Hallmark, and S. R. Archer. 2012. Spatial variation of soil $\delta^{13}\text{C}$ and its relation to carbon input and soil texture in a subtropical lowland woodland. *Soil Biol. Biochem.* 44: 102-112. doi: 10.1016/j.soilbio.2011.09.013.
- Bateman, A. S., S. D. Kelly, and M. Woolfe. 2007. Nitrogen isotope composition of organically and conventionally grown crops. *J. Agric. Food Chem.* 55: 2664-2670. doi: 10.1021/jf0627726.
- Bernoux, M., C. Cerri, D. Arrouays, C. Jolivet, and B. Volkoff. 1998. Bulk densities of Brazilian Amazon soils related to other soil properties. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 62: 743-749.
- Beverwijk, A. 1967. Particle size analysis of soil by means of the hydrometer method. *Sediment. Geol.* 1: 403-406. doi: 10.1016/0037-0738(67)90070-X.
- Carvajal, A. F., A. Feijoo, H. Quintero, and M. Rondón. 2009. Carbono orgánico del suelo en diferentes usos del terreno de paisajes andinos colombianos. *Rev. Cienc. Suelo Nutr.* 9: 222-235. doi: 10.4067/S0718-27912009000300005.
- Craine, J., E. N. J. Brookshire, M. D. Cramer, N. Hasselquist, K. Koba, E. Marin-Spiotta, and L. Wang. 2015. Ecological interpretations of nitrogen isotope ratios of terrestrial plants and soils. *Plant Soil* 396: 1-26. doi: 10.1007/s11104-015-2542-1.
- Dawoe, E. K., J. S. Quashie-Sam, and S. K. Oppong. 2014. Effect of land-use conversion from forest to cocoa agroforest on soil characteristics and quality of a Ferric Lixisol in lowland humid Ghana. *Agrofor. Syst.* 88: 87-99. doi: 10.1007/s10457-013-9658-1.

- de Rouw, A., B. Soulileuth, and S. Huon. 2015. Stable carbon isotope ratios in soil and vegetation shift with cultivation practices (Northern Laos). *Agric. Ecosyst. Environ.* 200: 161-168. doi: 10.1016/j.agee.2014.11.017.
- Diomande, D., I. Antheaume, M. Leroux, J. Lalande, S. Balayssac, G. S. Remaud, and I. Tea. 2015. Multi-element, multi-compound isotope profiling as a means to distinguish the geographical and varietal origin of fermented cocoa (*Theobroma cacao* L.) beans. *Food Chem.* 188: 576-582. doi: 10.1016/j.foodchem.2015.05.040.
- Dixon, E. R., M. S. A. Blackwell, M. S. Dhanoa, Z. Berryman, N. de la Fuente Martinez, D. Junquera, A. Martinez, P. J. Murray, H. F. Kemp, W. Meier-Augenstein, A. Duffy, and R. Bol. 2010. Measurement at the field scale of soil $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ under improved grassland. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24: 511-518. doi: 10.1002/rcm.4345.
- Dortzbach, D., M. G. Pereira, É. Blainski, and A. P. González. 2015. Estoque de C e abundância natural de ^{13}C em razão da conversão de áreas de floresta e pastagem em bioma Mata Atlântica. *Rev. Bras. Ciênc. Do Solo* 39: 1643-1660. doi: 10.1590/01000683rbc20140531.
- Farquhar, G. D., J. R. Ehleringer, and K. T. Hubick. 1989. Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 503-537. doi: 10.1146/annurev.pp.40.060189.002443.
- Fontes, A. G., A. C. Gama-Rodrigues, E. F. Gama-Rodrigues, M. V. S. Sales, M. G. Costa, and R. C. R. Machado. 2014. Nutrient stocks in litterfall and litter in cocoa agroforests in Brazil. *Plant Soil* 383: 313-335. doi: 10.1007/s11104-014-2175-9.
- Gautam, M. K., K. S. Lee, B. Y. Song, D. Lee, and Y. S. Bong. 2016. Early-stage changes in natural ^{13}C and ^{15}N abundance and nutrient dynamics during different litter decomposition. *J. Plant Res.* 129: 463-476. doi: 10.1007/s10265-016-0798-z.
- Hernandez Jimenez, A., L. Vera Macias, C. A. Naveda Basurto, A. M. Guzman Cedeño, M. Vivar Arrieta, T. R. Zambrano, F. Mesías Gallo, K. Ormanza, R. V. León Aguilar, and G. A. López Alava. 2017. Variations in some soil properties because of the land use change in the middle and low parts of the Membrillo micro-watershed, Manabí, Ecuador. *Cult. Trop.* 38: 50-56.
- Herrmann, L., C. Felbinger, I. Haase, B. Rudolph, B. Biermann, and M. Fischer. 2015. Food fingerprinting: Characterization of the ecuadorean Type CCN-51 of *Theobroma cacao* L. using microsatellite markers. *J. Agric. Food Chem.* 63: 4539-4544. doi: 10.1021/acs.jafc.5b01462.
- Jadán, O., B. Torres y S. Günter. 2012. Influencia del uso de la tierra sobre almacenamiento de carbono en sistemas productivos y bosque primario en Napo, Reserva de Biosfera Sumaco, Ecuador. *Rev. Amazónica: Cienc. Tecnol.* 1: 173-186.
- Koba, K., Y. Fang, J. Mo, W. Zhang, X. Lu, L. Liu, T. Zhang, Y. Takebayashi, S. Toyoda, N. Yoshida, K. Suzuki, M. Yoh, and K. Senoo. 2012. The ^{15}N natural abundance of the N lost from an N-saturated subtropical forest in southern China. *J. Geophys. Res. Biogeosci.* 117: G02015, 1-13. doi: 10.1029/2010JG001615.
- Korenaga, T., Y. Suzuki, and Y. Chikaraishi. 2019. Biochemical stable isotope analysis in food authenticity. pp. 209-227. In: A. M. Grumezescu and A. M. Holban (eds.). *Engineering tools in the beverage industry. Volume 3: The science of beverages.* Elsevier Inc. Kidlington, UK. doi: 10.1016/B978-0-12-815258-4.00007-X.
- Loss, A., M. G. Pereira, E. M. Costa, and S. J. Beutler. 2014. Carbon, nitrogen and the natural abundance of ^{13}C and ^{15}N in macro and microaggregates. *Idesia* 15-21.
- Luna-Romero, A., I. Ramírez, C. Sánchez, J. Conde, L. Agurto, and D. Villaseñor. 2018. Spatio-temporal distribution of precipitation in the Jubones river basin, Ecuador: 1975-2013. *Sci. Agropec.* 9: 63-70. doi: 10.17268/sci.agropecu.2018.01.07.
- Monroe, P., E. Gama-Rodrigues, A. Gama-Rodrigues, and J. Marques. 2016. Soil carbon stocks and origin under different cacao agroforestry systems in Southern Bahia, Brazil. *Agric. Ecosyst. Environ.* 221: 99-108. doi: 10.1016/j.agee.2016.01.022.
- Moreno, J., G. Sevillano, O. Valverde, V. Loayza, R. Haro, and J. Zambrano. 2016. Soil from the coastal plane. pp. 27-77. In: J. Espinosa, J. Moreno, and G. Bernal (eds.). *The soils of Ecuador.* Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-319-20541-0. Cham, Switzerland.
- Nakano, A. and Y. Uehara. 2007. Effects of different kinds of fertilizer and application methods on $\delta^{15}\text{N}$ values of tomato. *Jpn. Agric. Res. Quar.* 41: 219-226. doi: 10.6090/jarq.41.219.
- Niether, W., U. Schneidewind, M. Fuchs, M. Schneider, and L. Armengot. 2019. Below- and aboveground production in cocoa monocultures and agroforestry systems. *Sci. Total Environ.* 657: 558-567. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.12.050.
- O'Leary, M. H. 1988. Carbon dynamics in photosynthesis. *BioScience* 38: 328-336.
- Paolini, M., L. Ziller, D. Bertoldi, L. Bontempo, R. Larcher, G. Nicolini, and F. Camin. 2016. $\delta^{15}\text{N}$ from soil to wine in bulk samples and proline. *J. Mass Spectrom.* 51: 668-674. doi: 10.1002/jms.3824.
- Park, S., T. Pérez, K. A. Boering, S. E. Trumbore, J. Gil, S. Marquina, and S. C. Tyler. 2011. Can N_2O stable isotopes and isotopomers be useful tools to characterize sources and microbial pathways of N_2O production and consumption in tropical soils? *Global Biogeochem. Cycles* 25, GB1001 doi: 10.1029/2009GB003615.
- Paul, S., H. Flessa, E. Veldkamp, and M. López-Ulloa. 2008. Stabilization of recent soil carbon in the humid tropics following land use changes: evidence from aggregate fractionation and stable isotope analyses. *Global Biogeochem. Cycles* 87: 247-263. doi: 10.1029/2010GB003876.
- Pérez Neira, D. 2016. Energy efficiency of cacao agroforestry under traditional and organic management. *Agron. Sust. Develop.* 36. 49. doi: 10.1007/s13593-016-0386-6.
- Perini, M., L. Bontempo, L. Ziller, A. Barbero, A. Caligiani, and F. Camin. 2016. Stable isotope composition of cocoa beans of different geographical origin. *J. Mass Spectrom.* 51: 684-689. doi: 10.1002/jms.3833.
- Puentes-Páramo, Y., J. Menjivar-Flores, A. Gómez-Carabalí, and F. Aranzazu-Hernández. 2014. Absorción y distribución de nutrientes en clones de cacao y sus efectos en el rendimiento. *Acta Agron.* 63: 145-152. doi: 10.15446/acag.v63n2.40041.
- Reyna-Bowen, L., L. Vera-Montenegro, and L. Reyna. 2019. Soil organic carbon concentration and storage under different land uses in the Carrizal-Chone Valley in Ecuador. *Appl. Sci.* 9: 1-9. doi: 10.3390/app9010045.
- Rhoades, C. C., G. E. Eckert, and D. C. Coleman. 2000. Soil carbon differences among forest, agriculture and secondary vegetation in lower montane Ecuador. *Ecol. Appl.* 10: 497-505.

- Rogers, K. 2008. Nitrogen isotopes as a screening tool to determine the growing regimen of some organic and nonorganic supermarket produce from New Zealand. *J. Agric. Food Chem.* 56: 4078-4083. doi: 10.1021/jf800797w.
- Rosas-Patiño, G., Y. J. Puentes-Páramo y J. Menjivar-Flores. 2017. Relación entre el pH y la disponibilidad de nutrientes para cacao en un entisol de la Amazonia colombiana. *Corpoica Cienc. Tecnol. Agropec.* 18: 529-541.
- Salgado-Mora, M. G., S. Espinosa-Zaragoza, J. N. Lerma Molina, S. Moreno-Limón y J. F. López-Olguín. 2009. Cuantificación, descomposición y contenido nutrimental de hojarasca en dos sistemas agroforestales con cacao (*Theobroma cacao* L.). *Quehacer Cient. Chiapas* 1: 10-15.
- Sánchez-Mora, F., J. Zambrano, J. Vera, R. Ramos, F. Gárces, and G. Vásquez. 2013. Productividad de clones de cacao tipo nacional en una zona del bosque húmedo tropical de la provincia de Los Ríos, Ecuador. *Cienc. Tecnol.* 7: 33-41.
- Snoeck, D., L. Koko, J. Joffre, P. Bastide, and P. Jagoret. 2016. Cacao nutrition and fertilization. pp. 155-202. *In*: E. Lichtfouse (ed.). *Sustainable agriculture reviews*. Springer Cham. Suiza. doi: 10.1007/978-3-319-26777-7.
- SPSS Statistics. 2013. *SPSS Statistics for Windows*. Chicago, IL, USA: IBM Corp. <https://www.ibm.com/us-en/marketplace/spss-predictive-analytics-enterprise>. (Consulta: noviembre 20, 2016).
- Squeo, F. and J. Ehleringer. 2004. Isótopos estables: Una herramienta común para la ecofisiología vegetal y animal. pp. 59-80. *In*: H. M. Cabrera (ed.). *Fisiología ecológica en plantas: Mecanismos y respuesta a estrés en los ecosistemas*. EUV. Valparaíso, Chile.
- Tezara, W., R. Urich, R. Jaimez, I. Coronel, O. Araque, C. Azocar, and I. Chacón. 2016. Does Criollo cocoa have the same ecophysiological characteristics than Forastero? *Bot. Sci.* 94: 563-574. doi: 10.17129/botsci.552.
- USDA-NRCS (United States Department of Agriculture-Natural Resources Conservation Service). 2014. Laboratory analysis of particles <2mm. pp. 60-69. *In*: R. Burt and Soil Survey Staff (eds.). *Soil Survey Field and Laboratory Methods Manual*. Soil Survey Investigations Report No. 51, Version 2.0. USDA-NRCS. Lincoln, NE, USA.
- Wang, C., B. Z. Houlton, D. Liu, J. Hou, W. Cheng, and E. Bai. 2018. Stable isotopic constraints on global soil organic carbon turnover. *Biogeosciences* 15: 987-995. doi: 10.5194/bg-15-987-2018.
- Zaia, F. C., A. C. Gama-Rodrigues, E. F. Gama-Rodrigues, M. K. S. Moço, A. G. Fontes, R. C. R. Machado, and V. C. Baligar. 2012. Carbon, nitrogen, organic phosphorus, microbial biomass and N mineralization in soils under cacao agroforestry systems in Bahia, Brazil. *Agrofor. Syst.* 86: 197-212. doi: 10.1007/s10457-012-9550-4.